

ESTUDIO DE LOS PRECURSORES EN LAS CÉLULAS GLIALES DURANTE EL DESARROLLO Y LA REGENERACIÓN DE LA VÍA ÓPTICA DE REPTILES.

Becaria: Elena Santos Gutiérrez

Directora del trabajo: C. Magda Yanes Mendéz

Proyecto de la DGCYT BFI 2001-3879.

INTRODUCCIÓN

La mielinización del Sistema Nervioso Central en vertebrados es uno de los procesos más complejos del desarrollo. En este caso algunas células progenitoras se diferenciarán en oligodendrocitos para formar los anillos de mielina que envolverán a los axones. Además, según los objetivos del presente proyecto, el conocer el origen de los precursores de los oligodendrocitos durante el desarrollo de la vía óptica se considera fundamental para paralelamente analizar también su origen durante el proceso de remielinización de esta vía. (Fig 1).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ejemplares de *Gallotia galloti* (Fam. Lacertidae) desde el estadio E31 (embrión) hasta adulto. Realizamos marcajes simples para inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa.

Para los marcajes de inmunofluorescencia utilizamos material sin fijar, el cual fue congelado rápidamente con nitrógeno líquido.

Para inmunoperoxidasa se fijaron unos cerebros en Paraformaldehído y otros en Bouin, y fueron cortados posteriormente en criostato y microtomo respectivamente. Algunos ejemplares fueron fijados en paraformaldehído e incluidos en parafina.

En cuanto a la metodología para microscopía electrónica, las diferentes partes que componen la vía óptica se fijaron en glutaraldehído al 2% y se incluyeron en durcupan. Después se prosiguió a cortar en ultramicrotomo para obtener semifinos y rejillas de la que obtuvimos fotografías para su estudio.

RESULTADOS

Marcadores de precursores de oligodendrocitos:

Se usaron anticuerpos que reconocen estadios tempranos (4F2) e intermedios (12F7 y 14F7) de la maduración de los oligodendrocitos en el SNC de rata. El marcaje en el lacér-

tido se distribuye por el techo óptico, diencéfalo, nervio óptico y se extiende por la capa del nervio de la retina afinándose a medida que nos acercamos al cuerpo ciliar con un patrón general más inmaduro que el de mamíferos.

4F2:

E33: Se observa marcaje de algunas células en la capa nuclear externa de la retina (c.n.e. Fig.2). E35: El marcaje desciende y se observa también en la capa plexiforme externa (c.p.e); la zona ventricular del hipotálamo se hace positiva. E36-Eclosión: Parte del marcaje se ha desplazado a las capa del nervio (c.n) y la capa ganglionar (c.g) .Se observan células 4F2 positivas dispuestas en filas paralelas en el nervio óptico (n.o) y en las diferentes capas del techo óptico, mientras que el marcaje en la z.v continúa.

12F7:

E33: No observamos células 12F7 positivas. E34: Se aprecia marcaje en algunas células de la futura c.n.e. A partir del E35 hasta la eclosión el marcaje se encuentra dispuesto en filas en el n.o (sobretudo cerca del Quiasma Óptico y en la región peripapilaris) y en la zona ventricular del hipotálamo, así como en la c.n y c.g.

14F7:

En el E32 el mesencéfalo está marcado positivamente. E34: Se marca parcialmente la población celular de la c.n.e y la c.p.e y la zona ventricular del hipotálamo. E35: En la c.p.i y la c.n hay marcaje en un estrato celular; se mantiene el marcaje de la z.v del hipotálamo. E37: Hay marcaje en la c.n y c.g, siendo menor el de la c.p.i y c.n. La z.v sigue siendo positiva. E40: Se destaca el marcaje del nervio óptico (Fig 3) así como el de la c.g que es más evidente (Fig 4). Adulto (1 año): Permanece el marcaje en la retina y en la z.v del hipotálamo.

Marcadores de mielina:

Anti-PLP (Proteolipid Protein) : Resultados obtenidos mediante inmunoperoxidasa: E35-E38: No hay marcaje en la vía óptica. E39: Comienza el marcaje, en el diencéfalo y en fibras paralelas al tracto óptico en el n.o, siendo más intenso en la zona extraretinal del nervio; también se marcan unas pocas fibras paralelas a las capas retinales y algunos cuerpos de oligodendrocitos en la c.n y c.g de la retina. E40: El marcaje se extiende por toda la c.n y la c.g de la retina, siendo mayor en la parte central de la misma. Desde Eclosión hasta Adulto el marcaje aumenta en intensidad gradualmente.

Anti-MBP (Myelin Basic Protein): Mediante inmunofluorescencia se observa marcaje a partir del E40 y va aumentando progresivamente hasta el Adulto. El patrón del marcaje observado coincide con el de la PLP.

Presencia de inhibidores:

Anti-Tenascina R: La Tenascina R es una proteína de la matriz extracelular a la que se le atribuye un papel inhibitor del crecimiento axonal y de la migración de oligodendrocitos. La reactividad con la técnica de inmunofluorescencia en ejemplares postnatales 2 semanas (post-2 sem) se observó en el n.o y la c.n y c.g de la retina; en un post-3 meses se marca además la capa de fotorreceptores (c.n.e) y el n.o está más fuertemente marcado en la zona periférica y la zona peripapilaris. En Adultos el marcaje se centra en la capa ganglionar y c.n de la retina.

Microscopía electrónica:

E39, E40, Posnatal, Adulto: Observamos anillos de mielina de diferente grosor tanto en la c.n y c.g como en el n.o aunque no todos los axones están mielinizados. Según avanzan los estadios hay más axones mielinizados y las vainas de mielina contienen más lamelas. La mielinización es mayor en la zona periférica del n.o que en la zona central; en la retina la zona cercana al cuerpo ciliar no contiene anillos mientras que la zona central –alrededores de la entrada del n.o- posee numerosos . Se aprecian también oligodendrocitos individuales con características ultraestructurales inmaduras (citoplasma poco electrodens, numerosas mitocondrias y algunos microtúbulos), lo cual corrobora los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

CONCLUSIONES

1-. Se propone un modelo de distribución de la línea de desarrollo de los oligodendrocitos en el sistema visual de reptiles.

2-. Se complementa con microscopía electrónica la tipología estructural de la población de oligodendrocitos y distribución de los distintos tipos de anillos de mielina en este sistema.

FIGURAS

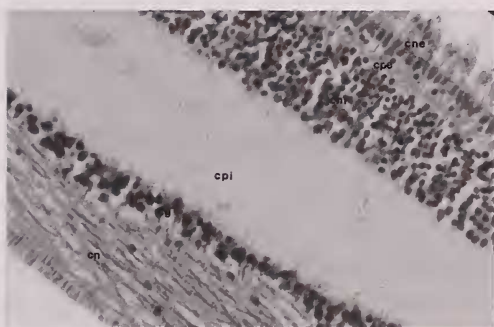


Fig. 1.- Sección horizontal de retina adulta con Klüver-Barrera, en la que se diferencian de izquierda a derecha las capas retinales: Capa del nervio, capa ganglionar, capa plexiforme interna, capa nuclear interna, capa plexiforme externa y capa de fotorreceptores (llamada también capa nuclear externa).



Fig. 2.- Inmunofluorescencia en sección horizontal de retina en el estadio E33 para el anticuerpo 4F2. La apa marcada corresponde a la futura capa nuclear externa.



Fig. 3.- Inmunofluorescencia para 14F7 en la entrada del nervio óptico a retina, E40, sección horizontal. Numerosos procesos de las células marcadas se extienden hacia la retina.



Fig. 4.- Sección horizontal de retina en E40. La inmunoperoxidasa para el 14F7 marca cuerpos celulares en la capa ganglionar cercana al cuerpo ciliar.